第 36 卷 第 3 期 1993 年 8 月
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
Vol. 36, No. 3 Aug., 1993

中华硬蜱和二棘血蜱的交叉免疫反应

刘志刚 宋杰益 彭卫东 崔晓民
(江西医学院寄生虫学教研室，南昌 330006)
张以耕 涂卫国 余金星 周江东
(江西奉新县卫生防疫站，336300)

摘要 本文首次比较了经中华硬蜱 (*Ixodes sinensis*) 叮咬三次后再经二棘血蜱 (*Haemaphysalis bispinosa*)叮咬的家兔与仅经二棘血蜱叮咬的家兔的交叉免疫抗性。二棘血蜱叮咬被中华硬蜱致敏的家兔时，吸血增重为：143.12±32.67mg，但二棘血蜱在正常家兔体上寄生，初次吸血增重为：181.30±44.35mg，两者之间有显著性差异 (P<0.01)。中华硬蜱和二棘血蜱唾液腺提取物 (SGE) 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)，显示两者分别有 24 条和 22 条电泳带，中华硬蜱主带有 6 条，分子量分别为 142、105、94、66/65、64 和 56kD，而二棘血蜱主带有 5 条，分子量分别为：215、114、105、66/65和 58kD，经中华硬蜱叮咬致敏的家兔血清和经二棘血蜱叮咬致敏的家兔血清作免疫印渍，均显示出 105kD这一电泳带。该实验表明中华硬蜱和二棘血蜱叮咬家兔两者之间存在着交叉免疫反应，提示 105kD 蛋白质抗原可能是两者的共同抗原。

关键词 中华硬蜱 二棘血蜱 交叉免疫反应

蜱媒疾病在全球范围内是一个非常严重的问题 (Bram, 1975)。蜱不仅传播大量各种各样的畜牧动物疾病，给畜牧业造成巨大经济损失外，还是仅次于蚊虫传播人类疾病的第二大媒介节肢动物 (Obenchain 和 Galun, 1982; Oliver, 1989)。控制媒介昆虫仍是防治这一大类复杂疾病的主要途径。当前控制蜱的措施主要是使用化学杀虫剂，这不仅给经济带来巨大负担，而且已引起蜱对化学杀虫剂抗性增加，同时还造成环境污染。因此，探讨一种替代方法来控制蜱及蜱媒疾病，正引起国外学者越来越多的关注。自从 Johnson 和 Bancroft (1918)首次报道蜱抗原诱导宿主产生获得性免疫力以来，近几十年国外对此已进行了许多研究，证实蜱叮咬宿主可诱导其产生有效的抗蜱免疫 (Wikel, 1982; Ackerman 等, 1980; Wikel 等, 1986)。但在已产生免疫力的宿主对其它蜱种叮咬，是否存在交叉免疫抗性，仅有少量报道 (McTier 等, 1981; Njan 等, 1987)。本文用二棘血蜱 (*Haemaphysalis bispinosa*) 感染被中华硬蜱 (*Ixodes sinensis*) 叮咬三次已产生免疫力的家兔，观察二棘血蜱和中华硬蜱之间相互交叉免疫抗性。现将结果报道如下。

材 料 与 方 法

一、受试动物

中华硬蜱和二棘血蜱均从江西奉新县和靖安县野兔体上采集，雌性成虫体重为

本文于 1991 年 9 月收到。
美国北达科他州立大学 Wikel 教授赠送有关参考文献，苏州医学院孟阳春教授鉴定有关硬蜱标本，在此一并表示衷心感谢。

6±2mg（由奉新县卫生防疫站提供），饲养在20±2℃、90±5% R.H. 的小型恒温箱内。

动物为家兔，共10只，体重2.25±0.25kg。家兔随机分为二组，即中华硬蜱叮咬后交叉叮咬组和单纯用二棘血蜱重复叮咬组，每组5只家兔，均为雄性（由江西医学院动物中心提供）。

二、试剂

样品缓冲液（0.186mol/L Tris-HCl，pH6.8，6% SDS，15%β-巯基乙醇，22.5%甘油）、转移电泳缓冲液（25mmol/LTris，192mmol/L 甘氨酸，20%甲醇；pH8.3）和DAB-H_2O_2系统（3,3-二氨基联苯二胺盐酸75mg，H_2O_2 100μl、1mol/L Tris-HCl pH7.6，5ml，H_2O 95ml）均为自配，所用试剂为分析纯。酶联A蛋白（SPA）为上海生物所产品。标准蛋白试剂为美国 Sigma 公司产品，其中肌球蛋白205KD、β-半乳糖苷酶116kD、磷酸化酶97.4kD、牛清蛋白 66kD 和卵清蛋白45kD。

三、感染

叮咬在室温下进行，方法依据 Nyindo 等（1990）方法。首先用中华硬蜱雌性成虫30只叮咬交叉叮咬组家兔的头部，叮咬重复三次，每批6—8天，间隔10天，叮咬前及每次叮咬后10天各收集血液一次，由耳缘静脉抽血分离血清。在中华硬蜱第三批叮咬后10天，用二棘血蜱叮咬，部位同前。同时用二棘血蜱叮咬单纯重复叮咬组家兔（30只蜱/兔/次）。每日收集两次吸饱血自行落下的二棘血蜱，单个在万分之一克的分析天平上称重。

四、蜱唾液腺提取物的制备

各将200只中华硬蜱和二棘血蜱放入冰箱中冰僵后解剖出唾液腺组织，分别放入4ml pH 7.4 PBS 缓冲液中，而后用微型玻璃匀浆器冰浴下匀浆。匀浆后唾液腺提取物（SGE）用振幅为22μm超声处理2分钟，反复4次，每次间隔3分钟。然后在4℃下、10000rpm 离心10分钟，吸取上清液，经 751-G 型分光光度计测定其样品的280nm OD值和260nm OD值，根据 Warbury 公式计算蛋白浓度，并调整至每毫升含蛋白质6—8mg。

五、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

中华硬蜱和二棘血蜱的 SGE 用一倍的样品缓冲液稀释，在100℃下加热5分钟，贮存在−20℃备用。SDS-PAGE 用10%不连续凝胶系统，电压120V、电流20mA，约5—6小时。取下凝胶用于①考马斯亮兰染色，②转移电泳（即蛋白印渍或免疫印渍）。

六、免疫印渍

参见 Burnette 等（1981）方法，将中华硬蜱和二棘血蜱经 SDS-PAGE 后的凝胶置入转移电泳缓冲液中30分钟，再将硝酸纤维素薄膜平铺于凝胶上，驱赶气泡，用滤纸、海棉垫、有机玻璃网夹紧后，插入盛有转移电泳缓冲液的电泳槽中，恒流60mA 20小时左右，取下硝酸纤维素薄膜，装入塑料袋中，仔细封口，在袋角剪一小口，注入3%BSA/PBS适量，用透析袋夹夹紧，37℃水浴振荡1小时，用 PBS/T 洗三次，分别加1:16用0.5%BSA/PBS稀释经中华硬蜱和二棘血蜱叮咬三次后的兔血清，37℃下4小时，PBS/T 洗三次，加适量酶联A蛋白，4℃冰箱过夜，PBS/T 洗三次，加显色剂 DAB-H_2O_2，室温下摇动5—20分钟，直到出现棕色条带并开始看到背景，立即放入清水中漂洗3—5分钟后晾干。

七、扫描

中华硬蜱和二棘血蜱的 SDS-PAGE 以及免疫印渍后的硝酸纤维素薄膜用岛津 CS-930 双波长薄层色谱扫描仪进行扫描。扫描条件：样品波 λ_s：580nm，光栅狭缝 10×0.2nm，扫描速度 20mm/分。

结 果

一、中华硬蜱与二棘血蜱交叉叮咬对吸血增重的影响

二棘血蜱单纯重复叮咬家兔和中华硬蜱叮咬三次后再用二棘血蜱交叉叮咬家兔，二者叮咬后吸血增重的结果见表 1。

表 1 二棘血蜱分别叮咬二组家兔后吸血增重情况

分组	第一次	第二次	显著性意义
单纯叮咬组	181.30±44.35	57.32±21.00	P<0.001
交叉叮咬组	（中华硬蜱先叮咬三次）	143.12±32.67	P<0.01

从表 1 可显示出，二棘血蜱单纯叮咬组第二批叮咬较首批叮咬吸血量明显减少（达 68.38%，P < 0.001），而二棘血蜱初次叮咬已对中华硬蜱产生获得性免疫力家兔的吸血量（143.12mg）较二棘血蜱单纯叮咬组家兔初次吸血量（181.30mg）略有下降，约为 21.06% 左右（P < 0.01）。但比单纯用二棘血蜱第二批感染吸血量（57.32mg）要高得多。

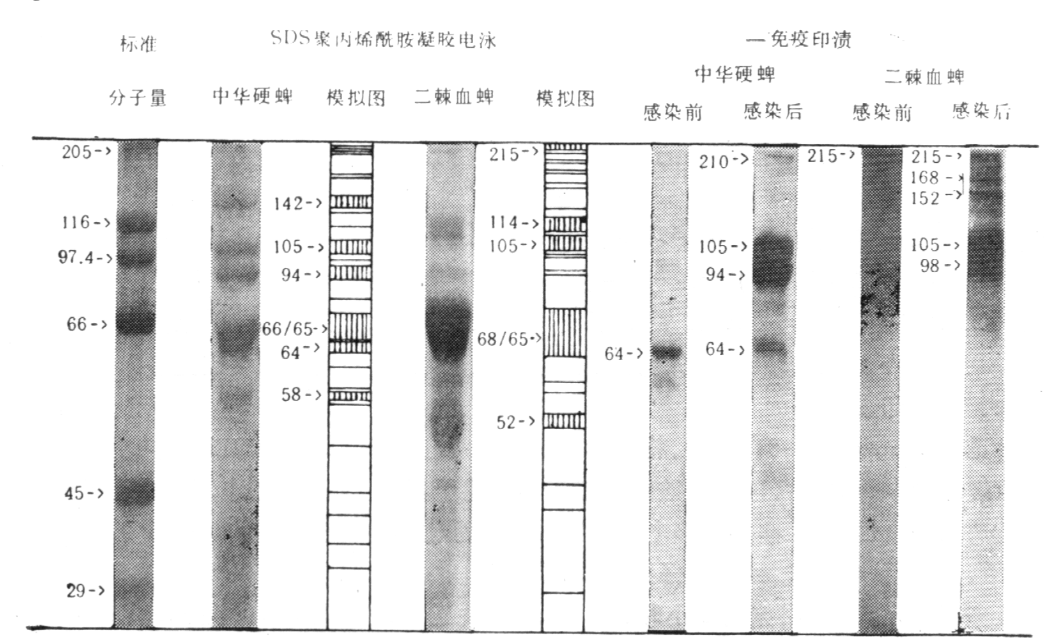


图 1 中华硬蜱与二棘血蜱 SDS-PAGE、免疫印渍图谱

二、二棘血蜱与中华硬蜱抗原成分的分析研究

二棘血蜱和中华硬蜱唾液腺提取物（SGE）经 SDS-PAGE 多次重复分析，二棘血蜱

和中华硬蜱各有 22 条和 24 条电泳带，带纹清晰、致密、重复性一致（图 1）。用已知分子量标准蛋白与二棘血蜱和中华硬蜱同时电泳，可测出相对迁移率，在半对数坐标图上绘制回归直线，再将各自电泳带的相对迁移率在图上查出各自的分子量。

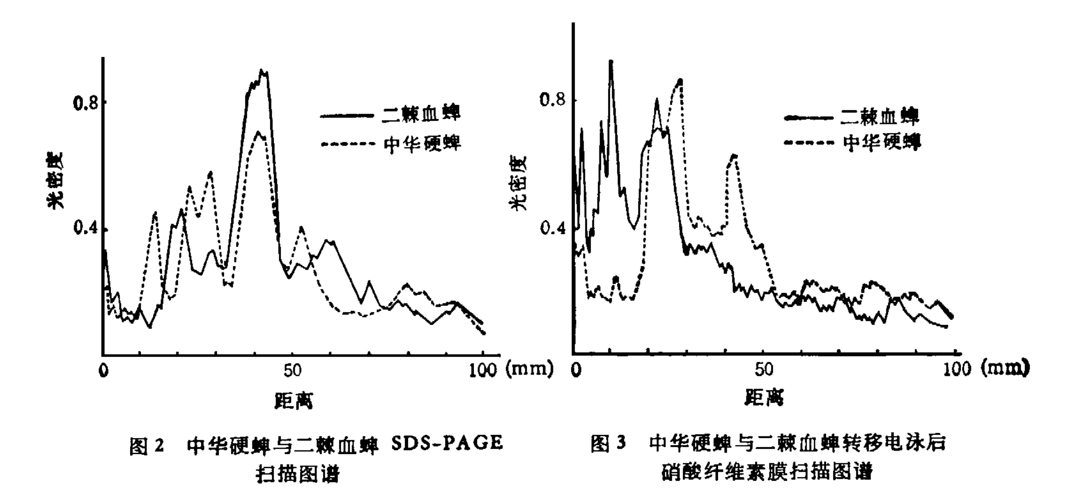


图 2　中华硬蜱与二棘血蜱 SDS-PAGE 扫描图谱

图 3　中华硬蜱与二棘血蜱转移电泳后硝酸纤维素膜扫描图谱

在二棘血蜱 22 条电泳带中，主带有 5 条，分子量分别为：215、114、105、66/65 和 52kD，而中华硬蜱 24 条电泳带中，主带有 6 条，分子量分别为：142、105、90、66/65、64 和 58kD，出现频率均为 100%（16/16）（见图 1）。

中华硬蜱和二棘血蜱 SDS-PAGE 电泳带的扫描曲线见图 2。

中华硬蜱和二棘血蜱的 SGE 经作 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳，然后转移到硝酸纤维素纸上，再分别用经中华硬蜱和二棘血蜱第三次叮咬后家兔血清与其分别作免疫印渍，结果见图 1。

用叮咬后兔血清做免疫印渍，中华硬蜱 SGE 可显示出 105 和 94kD 的两条深色、粗大电泳带和 210、64kD 两条淡色带，其中 64kD 电泳带用叮咬前兔血清做免疫印渍也可显色，二棘血蜱 SGE 可显示出 215、168、152、114、105 和 98kD 电泳带，其中 215kD 电泳带用叮咬前兔血清也可显色。105 和 98kD 为两条深色、粗大电泳带。

从蛋白印渍后扫描图形可见，中华硬蜱和二棘血蜱二者的印渍蛋白峰不同，中华硬蜱的主峰有三个，分子量分布在 64kD—105kD 这一区域内，而二棘血蜱的主峰有五个，分子量的分布在 98kD—215kD 之间。结果见图 3。

讨　　论

有关不同种硬蜱之间是否存在交叉免疫抗性，Njan 等（1987）在对两种扇头蜱进行交叉免疫研究中指出，*R. appendiculatus* 和 *R. evertsi evertsi* 这两种扇头蜱之间存在交叉免疫抗性，并且用 ELISA 方法证明两种蜱叮咬后宿主产生的抗体也存在交叉反应。

Brown（1988）在研究美洲花蜱时，发现该蜱与亲缘关系较远的微小牛蜱之间也存在共同抗原。Shapiro 等（1989）在对 *R. appendiculatus* 扇头蜱进行研究时发现，该蜱在叮咬豚鼠后，宿主对 *A. variegatum* 和 *A. gemma* 两种花蜱存在交叉免疫反应，经免疫

印渍分析,94kD 抗原有较广泛交叉反应性,但本实验显示 105kD 蛋白质抗原为中华硬蜱和二棘血蜱的共同抗原。

本实验观察发现,二棘血蜱叮咬对中华硬蜱有抵抗力的家兔后,其吸血量较单纯叮咬组首次叮咬有所减少,达 21.06%,表明中华硬蜱与二棘血蜱之间也存在低水平的交叉免疫抗性,其结果与上述报道相符。同时我们还对中华硬蜱和二棘血蜱的唾液腺提取物进行分析,发现这两者 SDS-PAGE 有明显差异,两者 SDS-PAGE 各有 24 和 22 条电泳带,其中各有 6 条和 5 条主带。另外,经免疫印渍发现中华硬蜱和二棘血蜱分别显示出 4 条和 5 条阳性带,并且各自分子量分布范围也不同。中华硬蜱特异性抗原主要分布在 66—105kD 这一范围内,而二棘血蜱抗原主要分布在 105—215kD 这一范围内。这一发现对今后抗原纯化,疫苗的生产都有现实意义。同时,在免疫印渍各自显示的带中,只有 105kD 电泳带相同,说明这一 105kD 分子量的抗原为中华硬蜱和二棘血蜱之间的共同抗原。

参 考 文 献

Ackerman, S. et al. 1980 Artificial immunity to *Dermacentor variabalis* (Acari: Ixodidae): vaccination using tick antigens. *J. Med. Entomol.* **17**(5): 391—7.

Bram, R. A. 1975 Tick-brone livestock diseases and their vectors. I. The global problem. *World Animal Rev.* **16**: 1—5.

Brown, S. J. 1988 Characterization of tick antigens inducing host immune resistance. II. Description of rabbit-acquired immunity to *Amblyomma americanum* ticks and identification of potential tick antigens by Western blot analysis. *Vet. Parasitol.* **28**(3): 245—59.

Burnette, W. N. 1981 "Western Blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**: 195—212.

McTier, T. L. et al. 1981 Resistance and cross-resistance of guinea pigs to *Dermacentor andersoni*, *D. variabilis*. *Amblyomma americanum* and *Ixodes scapularis* say. *J. Parasitol.* **67**(6): 813—22.

Njan. B. C. et al. 1987 Detection of immune response in rabbits infested with *Rhipicephalus appendiculatus* and *R. evertsi evertsi*. *Res. Vet. Sci.* **43**(2): 217—21.

Nyindo, M. et al. 1990 Immunization against ticks: Use of salivary gland antigens and infestations with *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) in rabbits. *J. Med. Entomol.* **26**(5): 430—4.

Obenchain, F. D. & R. Galun 1982 Preface in physiology of ticks. Pergamon Press, Oxford, UK. 20: 7.

Oliver, J. H. 1989 Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **20**: 397—430.

Shapiro, S. Z. et al. 1989 Acquired resistance to Ixodid ticks induced by tick cement antigen. *Exp. Appl. Acarol.* **7**(1): 33—41.

Wikel, S. K. 1982 Immune responses to arthropods and their products. *Ann. Rev. Entomol.* **27**: 21—48.

Wikel, S. K. et al. 1986 Immunological studies of Ixodid tick-host interaction: analysis of immunogens. *J. Toxicol-Toxin Rev.* **5**(2): 145—60.

CROSS IMMUNE REACTION BETWEEN *IXODES SINENSIS* AND *HAEMAPHYSALIS BISPINOSA*

LIU ZHI-GANG　SONG JIE-YI　PENG WEI-DONG　CUI XIAO-MIN
(Department of Parasitology, Jiangxi Medical College, Nanchang 330006)
ZHANG YI-QIN　TU WEI-GUO　YU JIN-XING　ZHOU JANG-DONG
(Fengxin Sanitary and Antiepidemic Station, Fengxin County, Jiangxi Province 336300)

A comparative study was conducted for the first time to test the cross immune reaction between rabbits sensitized by bites of *Ixodes sinensis* and *Haemaphysalis bispinosa*. When *H.* bispinosa fed on the rabbits which had been attacked for three times previously by *I. sinensis*, its body weight increased by 143.12±32.67 mg. But when it fed on the controlled rabbits not attacked previously by ticks the body weight increased by 181.30±44.35 mg, which showed significant difference in comparison with the former case. The homogenates of *I. sinensis* and *H. bispinosa* showed 24 and 22 proteins and protein subunits respectively in the SDS-PAGE patterns. The main bands of *I. sinensis* were 6 and their molecular weights were 142, 105, 94, 66/65, 64 and 58 KD. The main bands of *H. bispinosa* were 5 and their molecular weights were 215, 114, 105, 66/65 and 52 KD. The number of protein bands of *H. bispinosa* and *I. sinensis* were recognizable by the sera of rabbits attacked by *H. bispinosa* and by *I. sinensis*, and they both contained an immunoblot, the common antigen band identified which is a 105KD protein band. It is concluded that the immune response of the rabbits attacked by these two ticks stimulates the production of antibodies which show cross immune reactions and the 105 KD protein may serve as the antigen common in both ticks.

Key words　*Ixodes sinensis*——*Haemaphysalis bispinosa*——cross immune reaction